FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 9

SUR LE MÉTABOLISME DES SALICYLATES

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté
de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

le 8 Juillet 1955

par

Mohamed EL OUAHCHI

né le 28 Décembre 1928 à SFAX (Tunisie)

Pharmacien
Ex-aide de laboratoire de Chimie médicale
Préparateur de cours de Chimie biologique

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la thèse :

MM. DUMAZERT, Professeur — Président
DELPHAUT, » — Assesseurs
DERRIEN, » — Assesseurs
RECORDIER, » — Assesseurs

LINO-IMP. - BOUL. DESPLACES - MARSEILLE

Mohamed EL OUAHCHI

Pharmacien
Docteur en Pharmacie
Ex-Aide de laboratoire de chimie médicale
Préparateur de cours de chimie biologique

SUR LE MÉTABOLISME DES SALICYLATES

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Travail du laboratoire de chimie
de la Faculté de médecine de Marseille

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT

Professeurs honoraires : AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, MONGES.

Secrétaire Principal : J. COMTE — Bibliothécaire : Mlle PERRIN

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie médicale	DERRIEN
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique Chirurgicale thérapeutique et Chirurgie expérimentale	DE VERNEJOUL
Clinique Dermato-syphiligraphique	CHARPY
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	POURSINES
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER J.
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Préventive	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	DOR
Pathologie interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Stomatologie	MARONNEAUD
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans chaire	ROUX
» » »	DONNET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD Pierre	MM. GAMBARELLI	MM. MOURGUE
BOURRET	GREBUS	PASTOR
DEPIED	LISSITZKY	PAYAN
DESNATI	MERCIER Jacques	TAMALET

AGREGES EN EXERCICE

MM. APPAIX	MM. GRANJON	MM. ORSINI
BERNARD René	LAVAL	OURGAUD
CHARPIN	METRAS	PAOLI
CHAUVIN F.	MONGES H.	RAYBAUD
CREMIEUX	MOUREN	SERMENT
DEVIN	OLLIVIER	

AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER	MM. IMBERT
FIGARELLA	LAMY
HENRY	LENA
	VAGUE

Chargés des fonctions de Maitre de Conférences

Histologie	STAHL
Hygiène et Médecine Sociale	GEVAUDAN

A MES PARENTS,

A MES FRERES,

A MA SŒUR,

A MA FIANCEE.

Avec toute mon affection.

A MON MAITRE,

Monsieur le Professeur DUMAZERT,

dont j'ai l'honneur d'être l'élève. Il a su m'inculquer, au cours de ces cinq années que j'ai passées dans son laboratoire l'esprit et l'amour de la recherche.

Je lui dois toute ma formation en chimie.

Qu'il trouve dans ce modeste travail l'expression de mon entier attachement.

A Monsieur le Professeur DELPHAUT,

Assesseur du Doyen
Chevalier de la Légion d'honneur

Qui m'a facilité grandement ma tâche, en me permettant d'accomplir une partie de ce travail dans son laboratoire.

Qu'il veuille croire en ma sincère et respectueuse gratitude pour la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

A Monsieur le Professeur DERRIEN,

Qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son service et de me compter parmi son personnel.

Je lui exprime toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur RECORDIER,

auprès de qui j'ai trouvé l'accueil le plus aimable et qui a bien voulu s'intéresser à mon travail en acceptant de le juger.

A Maître Jacques MOLCO,

Avocat au Barreau de Marseille,

en remerciement pour l'intérêt amical qu'il m'a toujours témoigné au cours de mes études.

A Monsieur le Docteur A. ELADHARI,

A mon Maître de stage,

Monsieur le Docteur RIVEMALE,

en remerciements de leurs inestimables conseils.

A mes camarades des Laboratoires de Chimie et de Chimie Médicale.

INTRODUCTION

Les salicylates sont employés depuis plus d'un siècle dans le traitement du rhumatisme fébrile et le mécanisme de cette thérapeutique demeure encore assez obscur. Hippocrate, déjà, nous a montré l'usage des dérivés naturels du salicylate. Il les utilisait comme remède dans le traitement des ulcères. La Renaissance donna également une place prédominante aux salicylates. En 1874, *on les emploie comme antiseptiques et antipyrétiques. Deux ans plus tard, on reconnaît l'action analgésique de l'acide acétyl-salicylique ou aspirine. Les Etats-Unis produisent alors* 6.000 *tonnes d'aspirine par an. Un grand nombre de dérivés du salicylate furent introduits en thérapeutique, mais on n'a retenu que le salicylate de sodium et l'aspirine. En* 1927, *HANZLIK* (30) *a révisé tous les travaux se rapportant aux salicylates, et en* 1948 *GROSS et GREENBERG* (29) *ont présenté une bibliographie complète sur les salicylates* (4.000 *références). En* 1949, *J. SMITH publie une revue de pharmacologie des salicylates qui nous apporte un nouvel élément de discussion sur les travaux récents* (61).

Les salicylates s'éliminent très rapidement de l'organisme. Aussi est-on obligé de donner aux rhumatisants des doses répetées et fortes de salicylates. Jusqu'à ces dernières années l'élimination des substances traversant l'organisme était peu étudiée. Le mécanisme intime de l'élimination des médicaments salicylatés est encore obscur. Nous nous sommes attachés à élucider une partie tout au moins de ce mécanisme. Avant d'aborder notre travail, il serait intéressant d'examiner en premier lieu la chimie du salicylate de sodium, l'étude des acides phénols benzoïques (*).

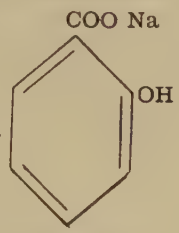
Nous serons amenés par la suite à faire un rappel succinct sur la physiologie, le métabolisme et le mode d'action des salicylates.

(*) Ces acides résultant de l'oxydation biologique du salicylate de sodium, se trouvent en rapport tres étroit avec ce dernier ; une étude détaillée des acides diphénols et triphénols benzoïques s'impose.

I. - Etude chimique du salicylate de sodium et des acides dihydroxy benzoïques et trihydroxy benzoïques

1° Etude chimique du salicylate de sodium

Le salicylate de sodium a pour formule :

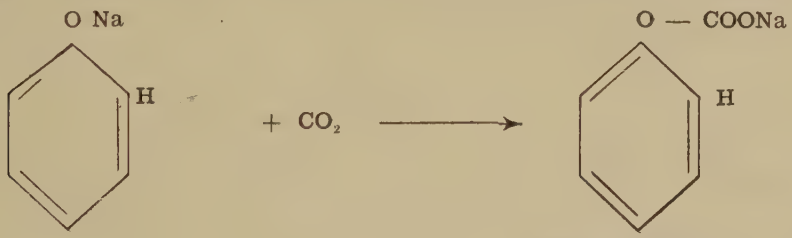


Il a pour poids moléculaire 160,037.

Préparation

On prépare le salicylate de sodium dans l'industrie par le procédé KOLBE et SMITH, en deux temps.

1° On fait passer sous pression et à 50° un courant d'acide carbonique sec sur du phenate de sodium sec. Il se forme alors un semi-ester carbonique



Phényl carbonate de sodium

2° Le phényl carbonate de sodium est porté à 130° pendant une heure sous une pression de 6 kg.; il se produit alors la transposition ci-dessous

salicylate de sodium

On peut aussi obtenir le salicylate, en saturant l'acide salicylique par le carbonate ou le bicarbonate de sodium.

Composition analytique

Le salicylate de sodium renferme
— 86,26 % d'acide salicylique et 14,37 % de sodium.

Caractères

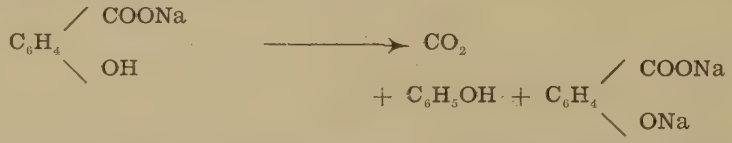
Le salicylate de sodium se présente sous forme d'aiguilles cristallines ou écailles brillantes, nacrées, inodores, de saveur à la fois salée et sucrée.

Solubilité

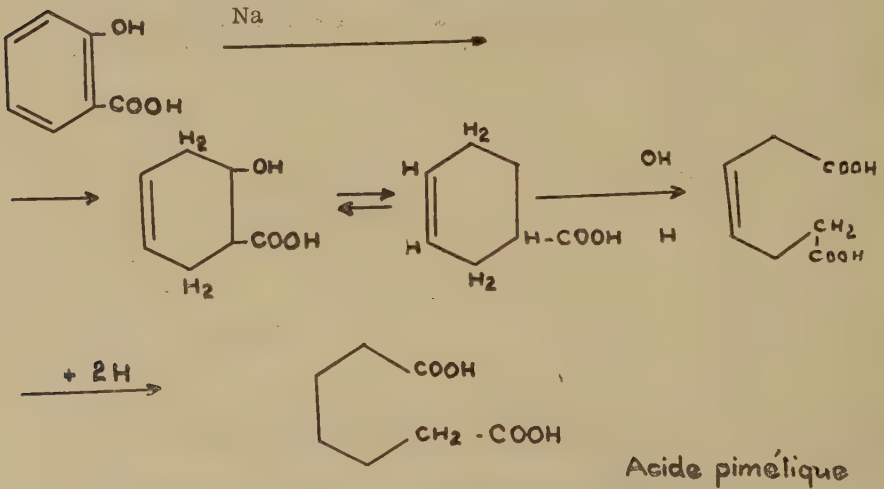
Le salicylate de sodium est soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther.

Il s'altère lentement à la lumière.

Il se colore en rose, puis en brun. Il se décompose sous l'action de la chaleur à 200°, avec perte de gaz carbonique et formation de phénol et de salicylate sodé.

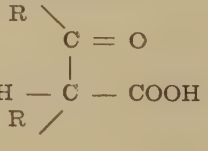


Le sodium au sein de l'alcool amylique et à l'ébullition, réduit l'acide salicylique (21 bis). Le noyau aromatique s'ouvre pour donner naissance à l'acide pimélique d'après les réactions suivantes :



Cette réaction est d'ailleurs à la base de la préparation de l'acide pimélique.

Nous avons tenu à signaler cette réaction car elle met en évidence l'instabilité d'un groupement du type



Cette instabilité se traduit par la facilité de la rupture par simple hydrolyse de la liaison existant entre le groupement cétonique (C = O) immédiatement voisin de l'atome de carbone supportant un groupement acide. Cette facile hydrolyse a pour résultat la rupture du noyau carboné hexagonal.

Nous verrons plus tard que ce mécanisme réactionnel nous a permis d'émettre une intéressante hypothèse sur l'ouverture du noyau aromatique.

Les acides dilués font précipiter l'acide salicylique. Le salicylate de sodium se colore en violet par le perchlorure de fer. La caféine se dissout plus facilement dans la solution de salicylate de sodium que dans l'eau.

BECKEMA-GOUDSMIT (7) ont remarqué que les colorations observées parfois dans les solutions de salicylate et de bicarbonate de sodium ne se manifestent pas en présence de petites quantités de calcium. Cette question a été examinée d'une façon plus générale par Grill (28). L'altération serait due à une oxydase, secrétée par une flore microbienne dans laquelle on a reconnu le Penicillium glaucum (45). L'addition de 0,50 pour 100 de citrate neutre de sodium permettrait d'éviter le passage du jaune au noir de la solution (16).

2° Etude chimique des acides dihydroxy et trihydroxybenzoïques.

A - Acides dihydroxy benzoïques

Ils sont au nombre de 6 (tableau 1) et dérivent des diphénols : pyrocatéchine, résorcine, hydroquinone.

Acide dihydroxy 2-3 benzoïque

On la rencontre dans les bourgeons de Populus balsamifera (27). Il forme un dihydrate. A l'état anhydre il fond à 203°-204°. Porté à 160° il donne de la pyrocatéchine par perte de gaz carbonique (32, 47). L'eau bouillante est sans action.

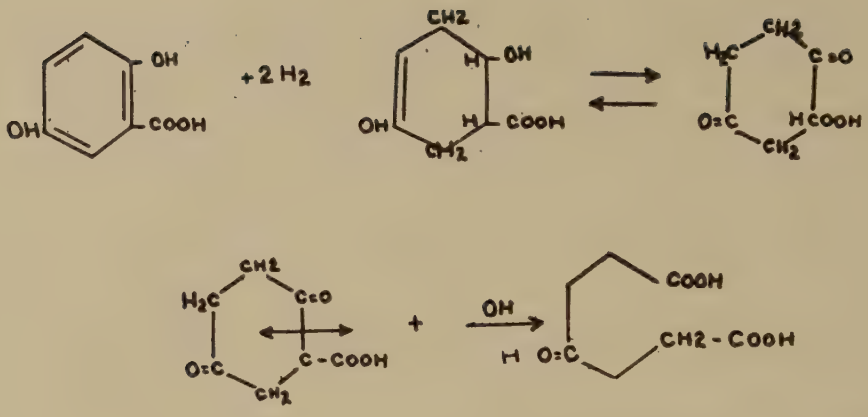
Acide dihydroxy 2-4 benzoïque

Cet acide ne se trouve pas à l'état libre dans la nature. Cependant, on a trouvé dans la racine de différentes espèces de Primula l'hydroxy 2 methoxy 4 benzoate de méthyle combiné sous forme glucosidique.

L'acide dihydroxy 2-4 benzoïque forme une série d'hydrates qui sont tous décomposés à 100° (8, 66). Le point de fusion est difficile à prendre au bloc de Maquenne par suite de la décarboxylation partielle

Acide dihydroxy 2-5 benzoïque

C'est l'acide gentisique. On le retire des racines et des rhizomes de Primula acaulis. Il fond à 196°-197° (26). Il est soluble dans l'eau, l'alcool et l'éther. Les solutions alcalines de cet acide brunissent à l'air (26). Une réduction préalable par l'amalgame de sodium suivie d'une hydrolyse alcaline puis acide ouvre le cycle de l'acide gentisique pour donner l'acide gamma-ceto-pimélique.



Acide gamma Cetо pimélique

Ce mécanisme réactionnel est à rapprocher de celui que nous avons déjà signalé relativement à l'obtention de l'acide pimélique à partir de l'acide salicylique (voir p. 4). Il traduit lui aussi une modalité de l'ouverture du noyau aromatique chez les acides phénoliques.

Acide dihydroxy 3-4 benzoïque.

C'est l'acide protocatéchique. On le rencontre dans les végétaux. Il prend naissance lors de l'hydrolyse alcaline de produits naturels tels que la catéchine, l'eugénol et un grand nombre de résines (4, 34). L'acide protocatéchique se décompose à 100°; il est soluble dans l'eau, dans l'alcool et dans l'éther. Il se décarboxyle dans l'organisme avec formation de pyrocatéchine (53).

Acide dihydroxy 3-5 benzoïque.

L'acide dihydroxy 3,5 benzoïque cristallise sous la forme d'un hydrate. Il fond à 225°-240° .Il est soluble dans l'eau, l'alcool et l'éther. Il est assez stable et ne perd que difficilement son carboxyle (33).

B - Acides trihydroxy benzoïques.

Ils sont au nombre de 6 (tableau II) et ils dérivent des 3 trihydroxy benzènes isomères.

— trihydroxy 1,2,3 benzène (pyrogallol),
— trihydroxy 1,2,4 benzène (hydroxy hydroquinone),
— trihydroxy 1,3,5 benzène (phloroglucine).

L'acide gallique est le seul produit rencontré dans les végétaux.

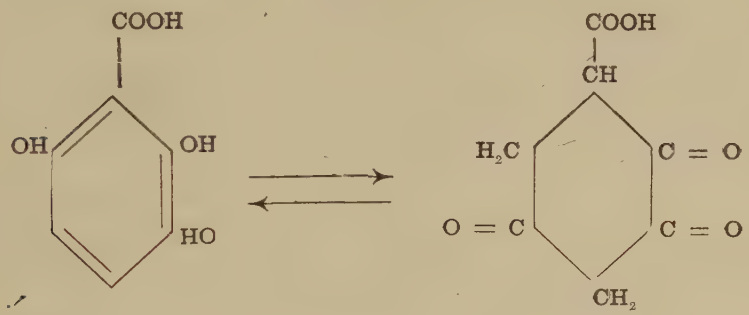
Acide trihydroxy 2,3,4 benzoïque.

Les hydrates se décomposent à 110° dans une atmosphère d'anhydride carbonique (58). Le point de fusion est variable parce qu'il s'accompagne de décomposition (57). Il donne avec le perchlorure de fer une coloration violette qui devient brun vert par dilution (58). L'acide pyrogallol carboxylique perd très facilement son carboxyle (57).

Acide trihydroxy 2-3-5 benzoïque.

C'est un acide instable et inconnu. On ne connait que les éthers obtenus par oxydation des aldéhydes correspondants (22, 49, 62).

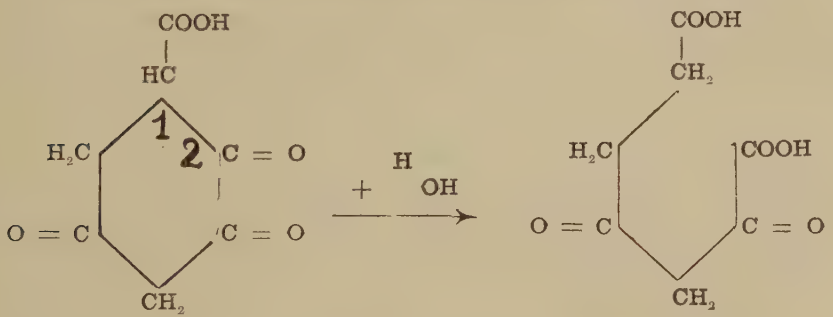
L'instabilité de cet article est telle que l'on n'a jamais pu l'obtenir par saponification de ses éthers. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de précision sur la nature des produits de dégradation qui se forment au cours de la saponification des tri-éthers de l'acide 2,3,5 benzoïque. On sait seulement que le noyau aromatique est ouvert. Nous ne pouvons donc qu'émettre à titre d'hypothèse le mécanisme suivant, par analogie aux réactions que nous avns déjà signalées relativement aux ouvertures du noyau aromatique des acides salicylique et gentisique qui donnent respectivement naissance aux acides pimélique et gamma ceto pimélique (voir p. 4 et p. 6). Ce mécanisme pourrait être le suivant, il nous faut considérer tout d'abord le passage de l'acide hydroxyle (I) sous la forme tri-cétonique (II) selon :



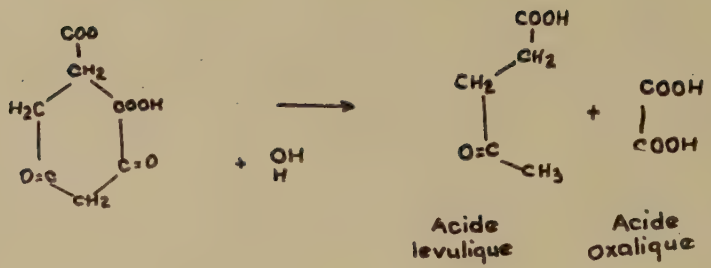
(I) (II)

Dans la formule (II) nous constatons la présence d'un groupement cétonique (C_2) relié par le carbone C_1 à un groupement acide. Une telle structure est en rapport avec la fragilité de la liaison entre les carbones C_1 et C_2 ainsi que nous avons eu l'occasion de le signaler à deux reprises (voir p. 5 et p.6).

On peut envisager la rupture de cette liaison par hydrolyse d'après :



Simultanément un mécanisme très analogue provoquerait la rupture de la liaison entre les carbone C_3 et C_4 selon :



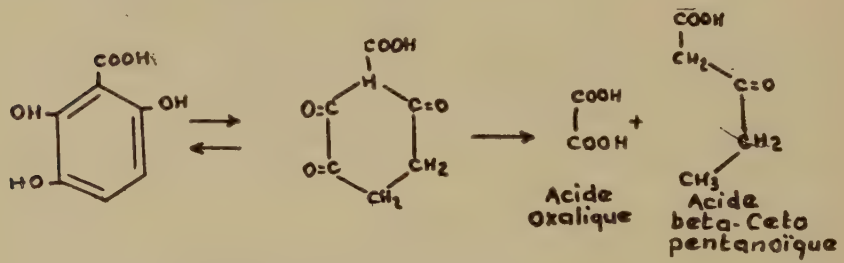
Si les ruptures du noyau aromatique ont lieu dans les positions indiquées ci-dessus, nous obtenons l'acide levulique et l'acide oxalique.

Acide trihydroxy 2,3,6 benzoïque ou 2,5,6 benzoïque.

Comme le précédent cet acide n'est pas connu. On connaît les éthers préparés par oxydation des aldéhydes correspondants (62).

L'instabilité de ce corps peut faire l'objet d'une hypothèse analogue à celle que nous avons formulée ci-dessus pour expliquer la dégradation spontanée de l'acide 2,3,5 hydroxy benzoïque.

Nous pouvons écrire les réactions :



Nous obtenons ainsi, d'une part, l'acide oxalique et d'autre part l'acide beta ceto pentanoïque.

Acide trihydroxy 2,4,5 benzoïque

On peut préparer cet acide à partir de l'hydroxy hydroquinone que l'on traite par le bicarbonate de sodium dans un courant d'anhydride carbonique (65). Il fond à 217°-218° (65). Il est soluble dans l'eau et dans l'alcool. Il se décarboxyle dans l'eau bouillante (34).

Acide trihydroxy 2,4,6 benzoïque.

On le prépare à partir de la phloroglucine que l'on traite par du bicarbonate de potassium (69). Il se décompose à 206° (6'). Il est peu soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et l'éther (69). Il donne avec le perchlorure de fer une coloration bleue qui passe au brun sale (69).

Acide trihydroxy 3,4,5 benzoïque.

C'est l'acide gallique. On l'extrait des noix de galle fermentées. Le tannin renferme une assez forte proportion d'acide gallique. Le tannin

turc fournit à l'hydrolyse 87,5 % d'acide gallique. Il se décarboxyle au cours de la distillation sèche (52). Il réduit la liqueur de Fehling. Il possède une saveur sucrée et exerce une action diurétique. La dose mortelle pour le lapin est 3,232 gr. par kilogramme. La mort survient par paralysie des centres nerveux et de la respiration (23).

Nous pouvons résumer les principales propriétés des acides dihydroxy benzoïques dans les tableaux suivants I et II.

TABLEAU I

ACIDES DIHYDROXYBENZOIQUES

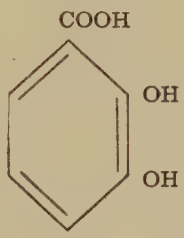
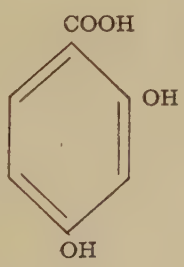
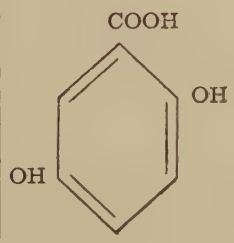
NOMS	FORMULES	FUSION	Coloration avec le sel de Cl_3Fe
Acide dihydroxy 2,3 benzoïque ou pyrocatéchol carboxylique 3.		203° à 204°	bleu
Acide dihydroxy 2,4 benzoïque ou beta résorcylique		194° à 236°	rouge
Acide dihydroxy 2,5 benzoïque ou gentisique.		196° à 197°	bleu foncé

TABLEAU I (suite)

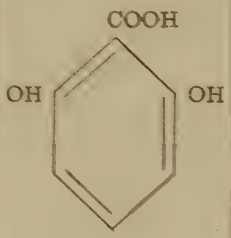
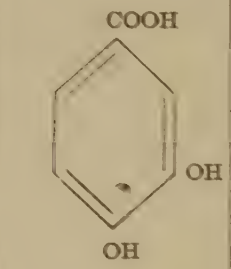
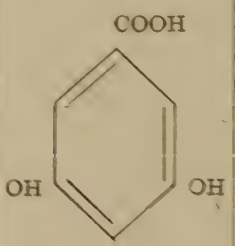
NOMS	FORMULES	FUSION	Coloration avec le sel de Cl_3Fe
Acide dihydroxy 2.6 benzoïque ou gamma résorcylique.		148° à 172°	violet bleu
Acide dihydroxy 3,4 benzoïque ou protocatéchique.		198° à 200°	vert
Acide dihydroxy 3,5 benzoïque ou alpha résorcylique.		225° à 240°	violet fugace

TABLEAU II

ACIDES TRIHYDROXYBENZOIQUES

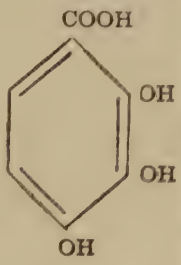
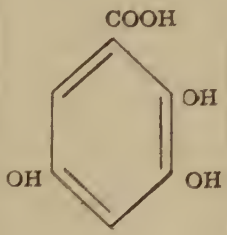
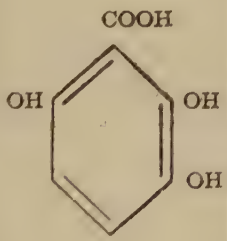
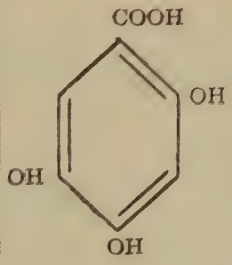
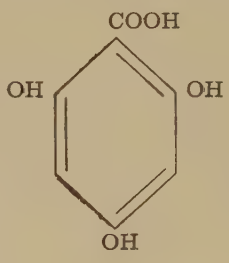
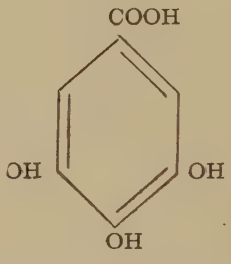
NOMS	FORMULES	FUSION	Coloration avec le sel de Cl_3Fe
Acide trihydroxy 2,3,4 benzoïque (ac. pyrogallol carboxylique).		220°	violet
Acide trihydroxy 2,3,5 benzoïque.		n'est pas connu à l'état libre	
Acide trihydroxy 2,3,6 benzoïque.		n'est pas connu à l'état libre	
Acide trihydroxy 2,4,5 benzoïque (ac. hydroxy hydroquinone carxylique).		217° à 218°	bleu à rouge

TABLEAU II (suite)

NOMS	FORMULES	FUSION	Coloration avec le sel de Cl_3Fe
Acide trihydroxy 2,4,6 benzoïque (ac. phloroglucine carboxylique).			bleu
Acide trihydroxy 3,4,5 benzoïque (ac. gallique).		239° à 240°	précipité bleu noir

II. - Propriétés physiologiques, métabolisme et mode d'action du salicylate de sodium

1° Propriété physiologiques du salicylate de sodium :

Absorption.

a) **voie cutanée.** — La peau absorbe facilement le salicylate et ses dérivés (48).

b) **cavité buccale.** — L'absorption par cette voie est lente. Il faut attendre, chez le lapin, 25 à 50 minutes pour voir apparaître dans les urines des traces d'acide salicylique (10).

c) **estomac.** — Le salicylate est vite absorbé par les muqueuses de l'estomac. Deux tiers de la dose franchissent cette barrière dans l'intervalle d'une heure (12). La vitesse d'absorption dépend de la durée de séjour. Les mélanges effervescents contenant du salicylate diminuent la durée de séjour dans l'estomac (44). Ceci est dû à l'alcalinité faible de la solution et, d'autre part, à la production de CO_2.

d) **intestin.** — Les salicylates sont absorbés plus rapidement que l'aspirine (12).

e) **rectum.** — L'absorption par cette voie est très lente (35).

Certains auteurs ont démontré que cette voie d'administration est possible en clinique (35).

Voie parentérale. — Injecté sous la peau d'un lapin, le salicylate apparaît dans le sang avec une concentration maximum, 30 à 40 minutes après l'injection. Injecté par voie intramusculaire, le salicylate apparaît dans les urines au bout de 30 minutes (11). L'injection intratrachéale est suivie d'une absorption rapide ,le médicament apparaissant dans l'urine 2 à 12 minutes après administration (9).

Taux plasmatique.

Le taux de salicylate du plasma est différent de celui des globules sanguins (43, 63). Après l'absorption par voie buccale de 2 gr. de produit chez l'homme, le taux minimum moyen dans le sang est d'environ 15 mg. %, il est atteint en 10 à 120 minutes (63).

Répartition dans le corps.

Le salicylate de soude diffuse rapidement dans les organes. Une partie se fixe sur le foie, l'autre partie se retrouve sous diverses formes dans la circulation générale ; elle est alors soit libre, soit combinée aux protéines du plasma et des globules. La moitié du salicylate dans le sérum est combinée aux protéines (63). On a émis l'hypothèse selon laquelle le salicylate serait combiné au cholestérol (64). Certains auteurs ont démontré qu'il existe une légère accumulation dans les érythrocytes (63). Des études récentes prouvent que les concentrations de salicylate dans le sang et les liquides articulaires sont similaires (60) ; elle est la même dans le foie, les reins et le poumon (63). Le salicylate traverse la barrière placentaire. Les concentrations dans le sang, chez une lapine gestante, est d'environ les 2/3 de celle du sang maternel (38).

Le salicylate n'irrite pas les muqueuses du tube digestif (21). Les malades soumis au traitement salicylé ne présentent à l'examen gastroscopique aucun signe d'hyperémie, ni d'hémorragie ; il entraîne à la longue une baisse du taux de la prothrombine dans le sang. Certains médecins américains attribuent ce fait à une inhibition de la synthèse hépatique de la prothrombine (1) ; il abaisse considérablement la vitesse de sédimentation lorsqu'elle est élevée (37). Certains auteurs affirment que le traitement salicylé accroît l'élimination de la vitamine « C ». Le salicylate de sodium possède une propriété antipyrétique et analgésique. La chute de la température chez les malades atteints de rhumatismes articulaires aigus est importante (5, 6, 19). Le salicylate calme les douleurs. Il provoque une accélération du rythme respiratoire. Ceci est dû à une action centrale directe (70). Le salicylate à doses fortes et prolongées s'avère toxique. Les signes d'intoxication sont les suivants : bourdonnements d'oreilles, surdité et nausées. Certains malades présentent en outre des troubles psychiques qui rappellent ceux de l'intoxication alcoolique.

2° Métabolisme du salicylate de sodium :

La principale voie d'élimination des salicylates absorbés est l'urine. On en rencontre quelques traces dans la sueur et dans les fécès (50).

KAPP et COBURN (40) ont mis en évidence les produits qui proviennent du métabolisme de l'acide salcylique. Ces auteurs ont établi dès données précises concernant l'élimination urinaire des salicylates. Ils ont montré que l'administration du salicylate de soude à l'homme adulte normal est suivie de l'élimination de salicylate intact dans les proportions de 16 %, d'acide salicylurique 44 % et de salicyl glycuronides 20 % et de l'acide gentisique 5 % de la dose ingérée (Tableau III). On a étudié le métabolisme de l'acide salicylique chez d'autres espèces telles que le lapin. Les auteurs démontrent que les produits du métabolisme des salicylates sont les mêmes que chez l'homme (13, 14). Ils ont retrouvé dans l'urine de l'acide gentisique simple et combiné. Les produits qui proviennent du métabolisme de l'acide salicylique chez différentes espèces sont résumés dans le tableau IV.

TABLEAU III

METABOLISME DE L'ACIDE SALICYLIQUE (40)

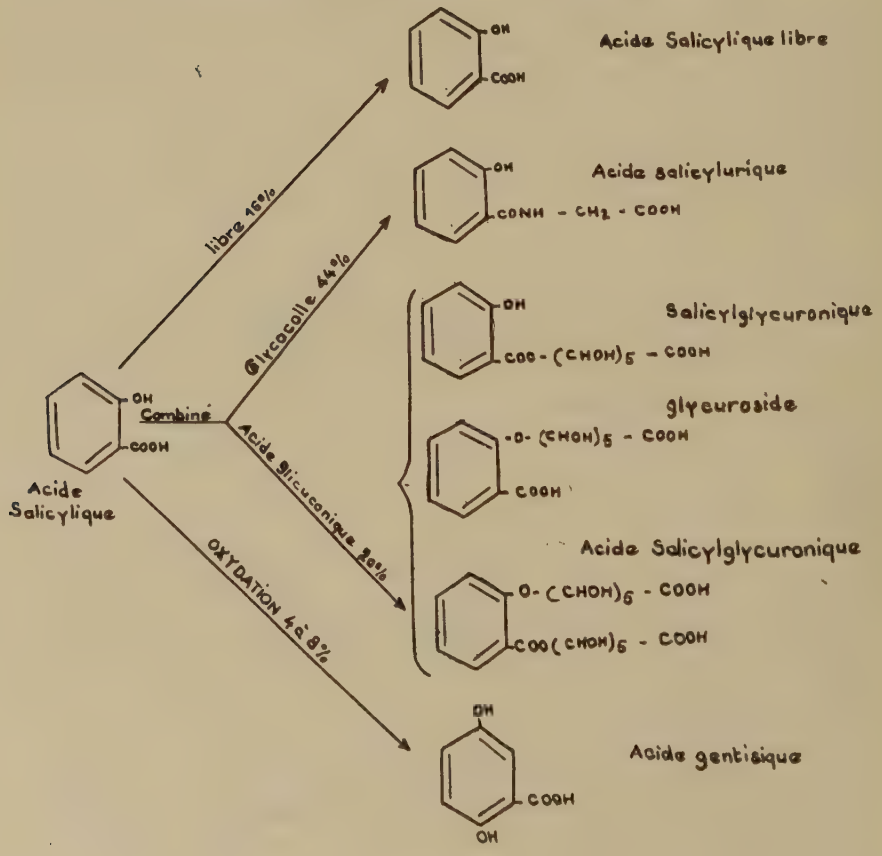


TABLEAU IV

ESPECES	PRODUITS DU METABOLISME DE L'ACIDE SALICYLIQUE en % la dose administrée					AUTRES SUBSTANCES	REFERENCE
	acide salicylique	acide salicyl-urique	acide gentisique	salicyl glycuronides			
				éther	ester		
chien	50	10	4 à 5	25	0		2
rat	4L à 63	1	18 à 34	1 à 3	0	Acide gentisique combiné probablement sous forme de gentisyl glycuronides.	54 63
lapin	85	5	4 à 5	5 à 14	3 à 4	a) 2,3 dihydroxy benzoïque ; b) ac. gentisique combiné	13, 14
homme	20	55	4 à 8	25			40
	20 à 95	0 à 50	1	15 à 40			2

Les études de KAPP et COBURN montrent, en outre, que les enfants éliminent 55 à 60 % des salicylates sous forme d'acide salicyl-urique et prouvent que ce produit de conjugaison est un important métabolite ; ils ont, par ailleurs montré que chez les malades, le taux d'excrétion d'acide salicyl-urique ne peut dépasser le 1/3 de la valeur totale des produits d'excrétion (40). Certains auteurs ont constaté au cours du traitement salicylé, une augmentation des substances réductrices dans les urines et ont attribué ce fait à l'acide glycuronique qu'ils ont dosé (46). Quelques salicylates sont éliminés avec une molécule d'acide glycuronique, d'autres, avec deux molécules (25). On a constaté que le taux de salicylate, éliminé sous forme de glycuronides chez des malades atteints de rhumatismes, est plus élevé que chez les malades fébriles. Ceci serait dû au fait que le salicylate est mieux métabolisé chez les rhumatisants (37, 63). BALDONI a isolé un corps de formule $C_{16}H_{15}O_8$, qu'il a appelé acide uramique salicylique (3). Ces recherches ont été confirmée par KAPP (37).

Le métabolisme de l'acide acétyl-salicylique diffère peu de celui du salicylate de sodium. Le plasma humain hydrolyse difficilement l'acide acétyl-salicylique. Deux heures après l'administration, on le retrouve intact dans le plasma (43).

3° Mode d'action des salicylates :

Le mode d'action du salicylate de sodium est resté pendant longtemps obscur. La communication de HENCH, KENDALL et de leurs collaborateurs au Congrès International de Rhumatologie de New-York (149) fut sensationnelle entre toutes. On crut vaincre, par la cortisone et l'A.C.T.H., la polyarthrite chronique évoluptive, considérée jusqu'alors comme incurable. On chercha, en Amérique, à trouver d'autres applications aux médications nouvelles. Mais dans l'euphorie de cette victoire, on ne pessa nullement à établir un rapport entre la cortisone ou l'A.C.T.H. et le salicylate de sodium utilisé avec succès dans le traitement des rhumatismes inflammatoires.

H. VAN CAUWENBERGE a étudié le mode d'action de l'acide acétyl-salicylique ou aspirine ; il a montré que l'aspirine se dédouble dans l'organisme et que la salicylémie succédant à son absorption l'emporte sur celle du salicylate de sodium (55, 56). Il observa, d'autre part, un taux élevé dans l'élimination urinaire des corticoïdes réducteur et des 17-cétostéroïdes. Au même moment où les auteurs publièrent leur note sur l'augmentation des corticoïdes urinaires chez les rhumatisants traités par l'aspirine, d'autres communications vinrent confirmer les résultats. CHAMPY et DEMAY signalaient que des doses « massives ou prolongées » de salicylate entraînent au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques et des capsules surrénales du rat, des modifications histologiques pareilles à celles produites par l'A.C.T.H. et, en outre, une nette déplétion de l'ascorbie surrénalienne. Ces auteurs sont arrivés à conclure, après plusieurs expériences faites sur les rats et les grenouilles, à la probabilité au cours de la salicylothérapie d'une excitation de l'hypophyse avec hypersecrétion secondaire de la cortisone (17).

KELEMEN, MAJOROS, IVANYL et KOVACS (42) ont fait connaître les essais réalisés dans ce domaine sur 86 rats et 27 hommes. Ils ont observé qu'après administration chez l'homme ou l'animal, rhumatisant ou bien portant, de fortes doses de salicylates, des signes nets d'hypersecrétion d'A.C.T.H., se traduisant par une chute marquée des œsinophiles des images histologiques caractéristiques de la réaction d'alarme de SELYE, dans la rate, le thymus et les surrénales, et par un appauvrissement du cortex surrénalien en vitamine C.

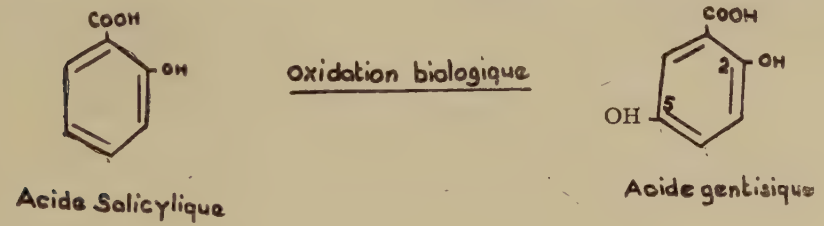
VAN CAUWENBERGE et LECOMTE (68) ont étudié comparativement la vitesse avec laquelle du « Chicago blue » injecté dans les veines du lapin, diffuse sous l'influence de la cortisone, de l'A.C.T.H. et des salicylates, dans le tégument cutané irrité par un tampon imbibé de chloroforme (test d'AMBROSE et de EDS). Ils ont démontré ainsi, dans ces conditions expérimentales, que la cortisone est dépourvue de toute action inhibitrice, que le salicylate de sodium intraveineux retarde de façon non négligeable la diffusion du colorant. Ces auteurs ont montré surtout que l'A.C.T.H. et le salicylate injectés par la voie intra-péritonéale exercent une action très semblable sur le test d'AMBROSE et de EDS. Cette concordance d'effets prouve donc la relation étroite qui existe entre la cortisone, l'A.C.T.H. et le salicylate de sodium.

Nous pouvons donc conclure que le salicylate de sodium en cure continue à des sujets bien portants ou malades, accroît d'une façon appréciable la quantité de corticoïdes réducteurs excrétés par les reins en donnant les mêmes réactions physiologiques et histologiques que l'A.C.T.H. Le salicylate de sodium agit en quelque sorte en stimulant les glandes endocrines. C'est ainsi qu'on lui a donné le nom de « A.C.T.H. like » ou mieux encore « A.C.T.H. producing substances » (67).

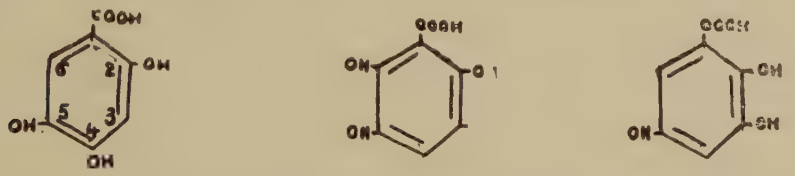
OBJET DU TRAVAIL

Le but de notre travail est précisément de mettre en évidence dans les urines d'hommes et d'animaux (lapins) ayant ingéré des salicylates, l'apparition de substances autres que l'acide salicylique libre ou combiné au glycocolle ou à l'acide glycuronique et autre que l'acide gentisique.

Notre attention a été attirée par l'importante étape métabolique qui consiste en l'oxydation de l'acide salicylique en acide gentisique.



Cette réaction met bien en évidence la faculté que possède l'organisme de fixer, par voie d'oxydation, une fonction phénolique sur l'acide salicylique. C'est ce qui nous conduit à formuler l'hypothèse de travail selon laquelle le métabolisme se poursuivait par fixation d'une nouvelle fonction phénol sur l'acide gentisique. On est ainsi amené à considérer un processus d'oxydation biologique donnant naissance à un acide trihydroxy benzoïque en passant par l'acide gentisique ou dihydroxy 2,5 benzoïque. Les positions des 2 hydroxyles (en 2 et en 5) étant déterminées par la mise en évidence de ce dernier comme intermédiaire de la chaîne métabolique envisagée, nous n'aurons à considérer parmi les acides trihydroxy benzoïques que les trois isomères suivants : les acides (2,4,5) (2,5,6) et (2,3,5) trihydroxy benzoïques.

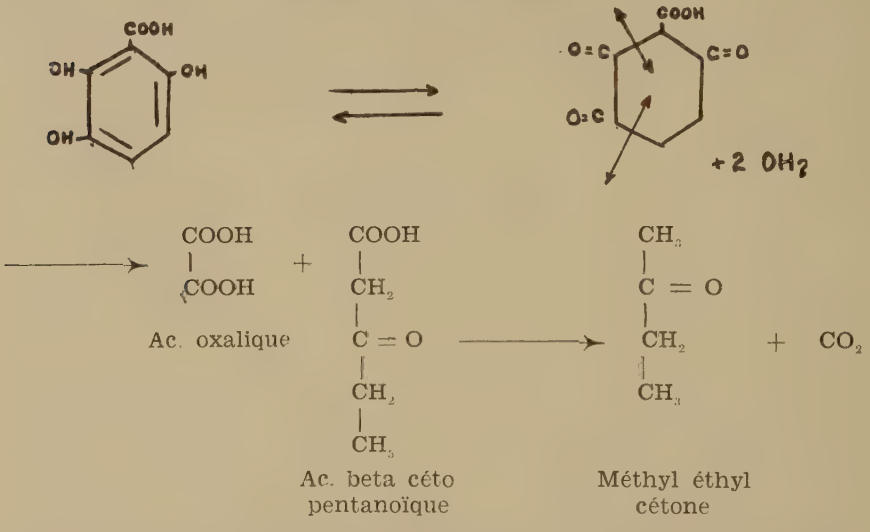


Le premier de ceux-ci, l'acide trihydroxy 2,4,5 benzoïque est connu. C'est un corps stable donnant avec le perchlorure de fer une intense coloration rouge. Il n'a jamais été décelé dans l'urine à la suite de l'ingestion de salicylate. Il ne nous retiendra donc pas davantage.

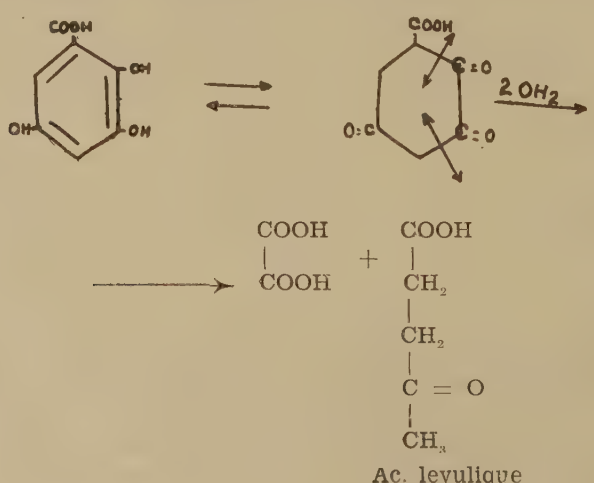
Les deux autres n'ont jamais pu être obtenus à l'état libre, mais on a pu préparer leurs dérivés où les trois fonctions phénols sont esté-

rifiées. Les tentatives de saponification de ces esters en vue de l'isolement des acides libres correspondants s'accompagnent inévitablement de la destruction de ces corps. Nous pouvons rappeler brièvement l'hypothèse que nous avons émise dans l'introduction, au cours de l'étude des acides phénols, selon laquelle le noyau aromatique des acides trihydroxy 2,3,5 et 2,5,6 benzoïque présente une analogie évidente avec le cycle des acides salicylique et gentisique, et que la dégradation instantanée du cycle ne peut avoir lieu qu'entre les carbones C_1 et C_2 (comme dans le cas des acides salcylique et gentisique) et entre les carbones C_3 et C_4 (la proximité du groupement acide alpha cetonique (R — CO — COOH) ayant pour effet de créer un point faible à ce niveau.

Dans ces conditions l'acide 2,5,6 trihydroxy benzoïque s'hydrolyserait spontanément en acide oxalique et en acide beta-cetopentanoïque qui se décarboxyle en donnant un corps volatil la méthyl-éthyl-cétone.



L'acide trihydroxy 2,3,5 benzoïque donnerait naissance à de l'acide oxalique et de l'acide levulique, d'après



Ainsi donc si l'organisme est capable d'oxyder l'acide salicylique en les acides trihydroxy 2,3,5 ou 2,5,6 benzoïques, ceux-ci ne peuvent pas exister à l'état libre dans l'urine. On peut cependant envisager leur élimination sous la forme de glycuroconjugués, le blocage des fonctions phénols par l'acide glycuronique (osidification) étant de nature à stabiliser la molécule à l'égal de l'estérification. Si tel est le cas, l'urine de sujets ayant ingéré des salicylates, soumise à une hydrolise préalable, sera le siège des réactions suivantes : les glycuronides seront scindés en acide glycuronique et en les acides trihydroxy 2,3,5 ou 2,5,6 benzoïques qui donneront spontanément naissance à leur produit de destruction parmi lesquels on devra pouvoir caractériser l'acide levulique ou la méthyl-éthyl-cétone.

Telle est l'hypothèse de travail que nous nous sommes proposés de vérifier expérimentalement.

En résumé :

Nous nous sommes attachés à mettre en évidence dans l'urine d'animaux (lapins) et d'hommes (rhumatisants) soumis à de fortes doses de salicylates de sodium et après hydrolyse ménagée, l'acide levulique qui ne peut tirer son origine que de la dégradation de l'acide trihydroxy 2,3,5 benzoïque.

RECHERCHES PERSONNELLES

Sur le métabolisme du salicylate de sodium chez le lapin

Nos premières expériences ont porté sur des lapins recevant chacun une dose quotidienne de salicylate de sodium. Notre travail a été conduit de la façon suivante :

Deux lapins mâles adultes sont introduits dans une cage à métabolisme d'assez grande dimension dont le fond est constitué par un grillage fin permettant de retenir les fécès et les débris d'aliments. L'urine est recueillie à travers le collecteur disposé en-dessous du grillage dans une éprouvette surmontée d'un entonnoir muni d'un filtre. Nous assurons ainsi une filtration constante de l'urine.

Pendant toute la durée de l'expérience nous avons soumis nos lapins à un régime complet répondant à la composition suivante : carottes hachées : 125 g. — son : 60 g. — avoine : 40 g. — eau : 100 g.

Chaque jour et à la même heure, la dose quotidienne de salicylate de sodium est administrée à chaque lapin de la façon suivante : on malaxe 0,60 gr. de salicylate à quelques gouttes d'eau de façon à obtenir une boule que l'on introduit à l'aide d'une spatule de bois au fond de la cavité buccale de l'animal. Nous sommes assurés ainsi que le lapin ingère en totalité la dose de salicylate mise en expérience.

Les urines sont recueillies à partir du troisième jour et pendant un durée de sept jours. Sur le volume de 800 cm3 collectés dans ces conditions nous avons réalisé les opérations suivantes dans le but d'isoler et de caractériser l'acide levulique.

Le mode opératoire que nous avons suivi comporte les temps suivants. En premier lieu, nous faisons subir à l'urine une hydrolyse acide dans le but de libérer les acides polyphénoliques de leur combinaison osidique (glycuroconjugués) et aussi pour assurer la décomposition spontanée des acides trihydroxy 2,3,5 et 2,5,6 benzoïque résultant éventuellement de cette hydrolyse. On procèdera ensuite à l'extraction des acides organiques solubles dans l'éther à partir de l'hydrolysat précédent. Cet extrait éthéré sera soumis à une première purification. Enfin nous procèderons à des analyses chromatographiques d'abord sur feuille puis sur colonne de cellulose. Enfin nous tenterons l'isolement et la caractérisation des acides cétoniques sous forme d'hydrazone et par réduction de cette dernière par passage à l'acide aminé correspondant.

Voici maintenant les détails techniques de ces diverses manipulations.

1° **Hydrolyse acide.**

L'urine est acidifiée par l'acide chlorhydrique dilué au demi, jusqu'à pH = 1. On chauffe une heure à l'ébullition sous réfrigérant à reflux. On concentre sous vide l'hydrolysat jusqu'au 1/10e de son volume, on ajoute alors quatre volumes d'alcool à 96° et on élimine par filtration le précipité qui est apparu. On chasse l'alcool du filtrat et on concentre sous vide le résidu acqueux jusqu'à consistance de sirop épais.

2° **Extraction des acides organiques par l'éther sulfurique.**

Le résidu obtenu est malaxé avec une quantité suffisante de sulfate de soude anhydre pour obtenir une poudre qui est introduite dans la cartouche d'un appareil de Soxlhet. On épuise par 150 cm3 d'éther sulfurique pendant six heures. Puis on chasse l'éther, on obtient ainsi un liquide visqueux brunâtre.

3° **Purification.**

Le résidu est repris par 15 cm3 d'eau distillée. On filtre et on élimine le précipité constitué en grande partie par de l'acide salicylique. La liqueur acqueuse est additionnée d'un excès de carbonate de cuivre (2 g.) et portée à l'ébullition. Cette opération est longue et délicate. La réaction est terminée lorsqu'il n'y a plus de dégagement de gaz carbonique à l'ébullition. On filtre. Le filtrat est fortement coloré en vert émeraude. (*)

Nous avons étudié le spectre d'absorption de cette solution dans les radiations lumineuses visibles (spectro-photomètre Jean et Constant). Nous avons obtenu la courbe A (figure 1) qui traduit une absorption intense à 7750 A, absorption que nous retrouvons dans l'étude du spectre du sel de cuivre de l'acide levulique (figure 2 - courbe B).

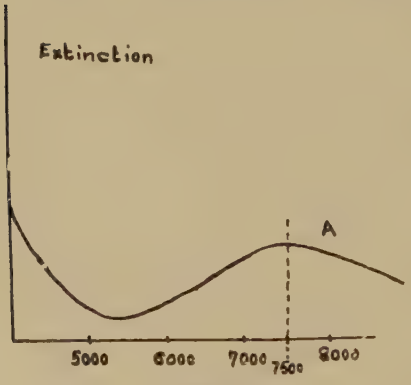


Figure I

spectre d'absorption du filtrat

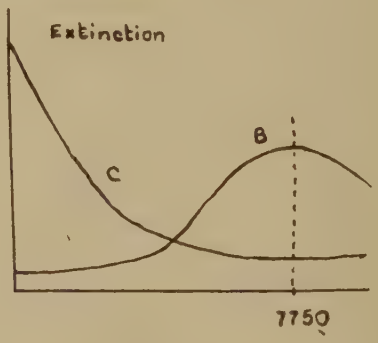


Figure II

B = Spectre d'absorption du sel de Cu de l'ac. levulique.

C = spectre d'absorption de l'ac. gentisique.

(*) L'acide levulique donne précisément un sel complexe dont les solutions acqueuses présentent cette même teinte vert émeraude à l'égal de beaucoup d'acides cétoniques.

Quant à l'absorption du proche infra-rouge elle est due au sel de cuivre de l'acide gentisique (figure 2 - courbe C).

De cette étude il ressort que la présence d'acide levulique dans l'urine après hydrolyse acide ménagée est probable. On précipite alors le cuivre de cette liqueur au moyen de l'hydrogène sulfuré. Ce dernier est chassé par ébullition, après élimination du sulfure de cuivre par filtration. On obtient ainsi une liqueur jaune paille que l'on soumet à une analyse chromatographique.

4° Analyse chromatographique.

Nous avons effectué une première analyse chromatographique sur feuille de papier selon la technique proposée par CHEFTEL, MUNIER et MACHEBŒUF (18) pour l'identification des acides organiques. Le solvant utilisé est le mélange éthanol-ammoniaque (alcool à 96° : 600 cm3, eau : 87 cm3 et ammoniaque RP . 36,8 cm3).

La révélation est effectuée par pulvérisation d'une solution neutre de vert de bromo-crésol (solution alcoolique à 0,1 % amenée à la neutralité par une solution N/10 de soude).

Les acides acides organiques apparaissent alors en jaune clair sur fond vert

Nous avons obtenu par cette technique un véritable chapelet de spot témoignant de la richesse de l'extrait urinaire en acides organiques divers. Parmi ceux-ci, nous en avons observé un présentant le même Rf que le spot de l'acide levulique déposé comme témoin (Soit Rf = C,57). Nous avons ensuite pulvérisé une solution acqueuse de perchlorure de fer à 1 % sur la feuille ayant été déjà soumise à la révélation par le vert de bromo-crésol. Cela nous a permis de retrouver des traces d'acide salicylique et en outre d'observer une réaction particulière à l'acide levulique. En effet, tandis que sous l'acidité de la solution de perchlorure de fer tout la feuille vire du vert à un jaune clair uniforme, le spot témoin correspondant à l'acide levulique demeure fortement coloré en vert. Il en est de même du spot que nous avions repéré comme présentant un Rf identique à celui de l'acide levulique.

Ces résultats rendent très probables la présence d'acide levulique dans l'extrait urinaire examiné.

5° Séparation des acides organiques par chromatographie sur colonne de poudre de cellulose.

Les expériences, réalisées par chromatographie sur papier, nous ont montré la présence probable d'acide levulique. Nous avons cherché à isoler cet acide par un fractionnement sur colonne de poudre de cellulose (Wathman Standard Grade). Le solvant utilisé est le mélange éthanol ammoniacal (18).

La chromatographie a été réalisée à la température du laboratoire (18°).

L'appareil que nous avons utilisé répond à la description suivante (Figue 3). Il est constitué par une colonne de verre de 54 cm. de hauteur sur 3 cm. de diamètre dont on relie l'extrémité inférieure à un tube de verre en T de 4 mm. de diamètre intérieur. Une branche ascendante A du T est recourbée dans le sens horizontal à 10 cm. environ du bord supérieur de la colonne. A l'extrémité de la branche horizontale du T est adapté le dispositif d'élution capillaire de C. DUMAZERT et M. BOZZI-TICHADOU (20) ; on adapte un tube de caoutchouc rigide

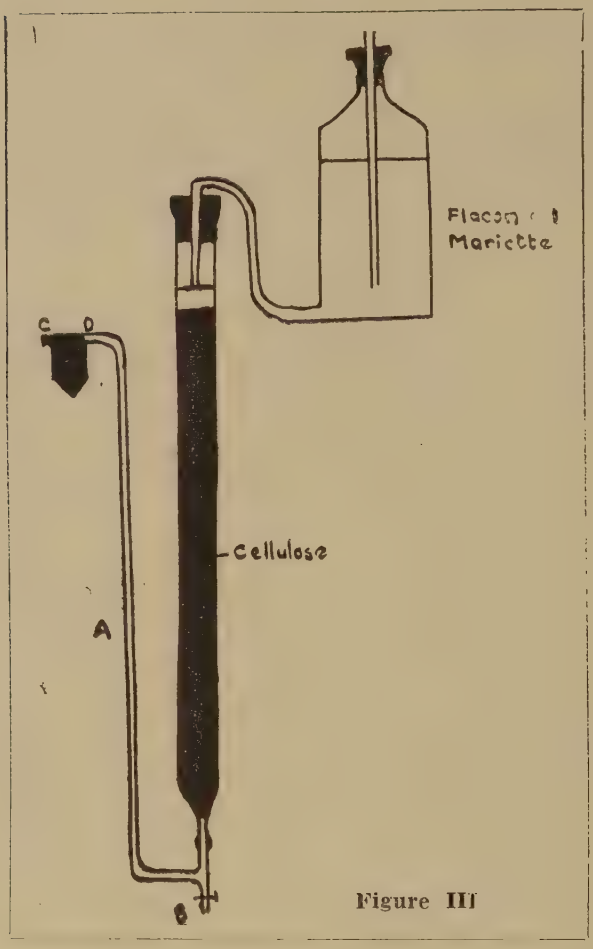


Figure III

bouché à une de ses extrémités et percé le long de sa génératrice supérieure de trois trous, 1, 2, 3 de 3 mm. de diamètre et séparés de 3 mm. environ. Par ailleurs, on se munit d'une bande de papier à chromatographie de 16 cm. de longueur sur 3 cm. de largeur dont les deux extrémités découpées en pointes sont amenées en coïncidence par un pli médian CD. Ce cavalier de papier est ensuite posé sur le tube de caoutchouc. Le liquide mouille alors les deux surfaces du papier qui accole, et s'écoule goutte à goutte. L'autre branche B du T est munie d'un robinet. L'alimentation en solvant a été réalisée à l'aide d'un flacon de Mariotte de manière à ce que le niveau du solvant surmontant la cellulose soit constant On règle la hauteur de l'élueur capillaire de manière à ce que le débit soit de 10 cm3 à l'heure.

Cette nouvelle technique nous permet d'obtenir un débit régulier du solvant. Ainsi nous n'avons plus le souci de surveiller l'appareil, une fois qu'il est en marche. En effet, le flacon de Mariotte, d'une part, nous permet d'avoir une hauteur h du solvant constante surpassant la poudre de cellulose dans la colonne, et, d'autre part, le dispositif d'élution capillaire, un débit régulier du solvant .De cette façon l'appareil peut fonctionner pendant 24 ou 48 heures sans acune difficulté.

Nous avons ainsi recueilli 25 fractions de 10 cm3. Nous avons recherché l'acide levulique par la réaction d'orientation suivante : on ajoute 2 gouttes d'une solution d'acide picrique et 2 gouttes de lessive de soude. L'acire levulique donne ainsi, à froid, une teinte orangée très intense. Les fractions qui donnent cette réaction sont réunies. On chasse l'alcool, reprend par 10 cm3 d'eau et on filtre (liqueur L).

Dans le but de vérifier si nous sommes bien en présence d'acide levulique, nous avons pensé à préparer son acide animé correspondant et vérifier par la suite si l'on obtient alors l'acide gamma amino valerianique. Pour cela, nous avons préparé une hydrazone que nous avons soumise à une réduction. Après isolement et purification de l'acide aminé ainsi préparé nous avons cherché à l'identifier par une analyse chromatographique.

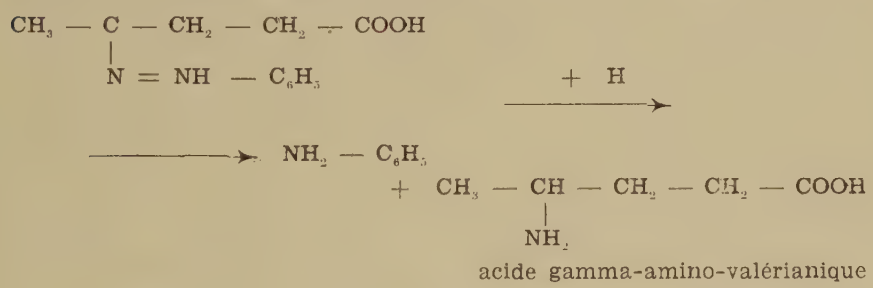
6° **Phényl hydrazone.**

Cette dernière liqueur (L.) est additionnée de phényl-hydrazine en milieu acétique (0,5 cm3 de phényl-hydrazine, 5 gouttes d'acide acétique pur et 5 cm3 d'eau d'eau distillée). Il se forme rapidement et à froid un précipité que l'on isole ; on le lave à l'eau, on le redissout dans le minimum d'alcool ; on ajoute 2 à 3 volumes d'eau et on chasse l'alcool par distillation. Par refroidissement, l'hydrazone cristallise (157 mg.), on la recueille, son point de fusion instantané a été trouvé égal à 108° ; il ne varie pas si on mélange l'hydrazone étudiée avec l'hydrazone de l'acide levulique pur qui fond également à 108°.

Nous avons ainsi obtenu une phényl-hydrazone identifiable à celle de l'acide levulique.

7° **Réduction de l'hydrazone.**

Pour assurer l'identification de l'acide levulique, nous avons réduit l'hydrazone par l'amalgamme d'aluminium (*) en milieu alcoolique, selon la technique proposée par FISCHER et GROH (24), pour la préparation de l'acide gamma-amino-valérianique par réduction de l'hydrazone de l'acide levulique d'après la réaction :



acide gamma-amino-valérianique

On réalise ainsi le passage de l'acide lévulique à l'acide gamma-amino-valérianique. Après élimination de l'aniline, de l'alcool et de l'alumine, on obtient une liqueur acqueuse que l'on soumet à l'analyse par chromatographie sur papier.

(*) On prépare l'amalgame d'aluminium en mettant en contact pendant quelques minutes de la tournure d'aluminium, dégraissée par lavage à l'éther, dans une solution acqueuse de bichlorure de mercure à 5 %.

8° **Analyse chromatographique.**

Le solvant utilisé est le mélange classique (butanol : 750 cm3, eau : 170 cm3, acide acétique : 100 cm3) ; la révélation est obtenue à l'aide de la ninhydrine (solution à 0,2 % de ninhydrine dans alcool butylique). Nous avons ainsi obtenu un spot dont le Rf a été trouvé identique à celui de l'acide gamma-amino-valérianique pur utilisé comme témoin (Rf = 0,30).

Ce résultat confirme la présence d'acide levulique dans l'hydrolisat urinaire étudié.

En résumé, nous sommes parvenus à identifier nettement l'acide levulique présent dans les hydrol isats des urines de lapins ayant ingéré du salicylate de sodium par des méthodes de chromatographie directe sur papier, chromatographie sur colonne, obtention de la levulyl-hydrazone pure et transformation de cette dernière en acide gamma-amino-valérianique.

Ajoutons que les hydrolysats d'urine de lapin soumis à une alimentation normale ne sont pas révélés contenir de l'acide levulique. Le chromatogramme des acides organiques ne présente pas de spot correspondant à celui de l'amice levulique.

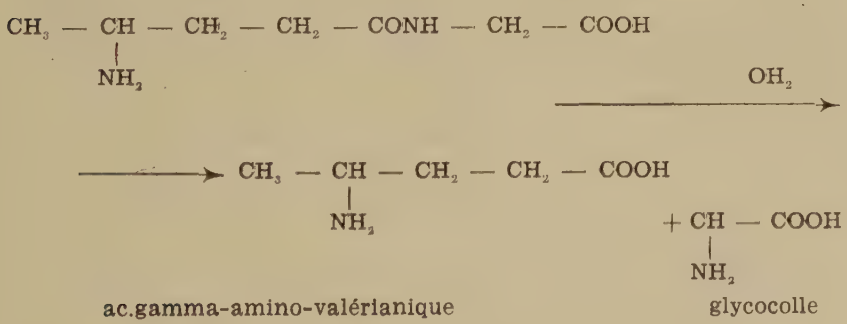
Après séparation des acides sur colonne de poudre de cellulose, la fraction donnant la réaction picro-sodique additionnée de phényl-hydrazone en milieu acétique ne donne lieu à aucune hydrazone, identifiable à celle de l'acide levulique.

En conclusion, l'acide levulique identifié dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus doit être considéré comme apportant la preuve que l'acide trihydroxy 2.3,5 benzoïque est un terme du métabolisme de l'acide salicylique chez le lapin.

Sur le métabolisme du salicylate de sodium chez l'homme

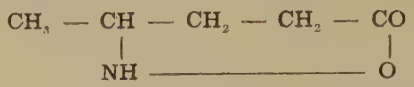
Nous avons soumis à une étude analogue à la précédente, les urines (1,2 litre) provenant d'un malade atteint de rhumathisme fébrile et traité par le salicylate de soude (8 gr. par jour). Nous nous sommes heurtés à certaines difficultés tenant au fait que dans l'urine humaine l'acide trihydroxy 2,3,5 benzoïque existe surtout à l'état d'un dérivé mixte consistant en une combinaison de sa fonction acide avec le glycocolle et ses fonctions phénol avec l'acide glycuronique. En effet, la première chromatographie destinée à la recherche des acides organiques dans l'extrait obtenu à la suite de l'hydrolyse ménagée de l'urine, nous a fourni un spot très peu intense et peu caractéristique de l'acide levulique.

La chromatographie sur colonne nous a conduit à collecter des fractions donnant une réaction picro-sodique positive, mais l'hydrazone préparée à partir de ces fractions fond à une température de 118° — (bloc Maquenne) nettement supérieur au point de fusion de la lévulyl-hydrazone. Enfin, la réduction de cette hydrazone par l'aluminium amalgame, nous a donné une solution dont l'analyse chromatographique s'est révélée négative en ce qui concerne la recherche de l'acide gamma-amino-valérianique. C'est alors que nous avons songé à soumettre cette dernière solution à une hydrolyse énergique (en tubes scellés à 110° pendant 12 heures) par l'acide chlorhydrique 6 N dans le but de vérifier si nous avions à faire à une combinaison de l'acide gamma-amino-valérianique avec le glycocolle d'après :



L'analyse chromatographique après cette hydrolyse nous a tout de suite permis d'identifier le glycocolle, mais sur le chromatogramme révélé à la ninhydrine le spot de l'acide gamma-amino-valérianique était absent. L'explication est cependant très simple ; à la suite de l'hydro-

lyse chlorhydrique, l'acide gamma-amino-valérianique apparaît sous la forme de lactame



inapte à réagir avec la ninhydrine. Il suffit d'un léger traitement en milieu alcalin pour ouvrir le cycle de la lactame ce qui permet sur un nouveau chromatogramme d'obtenir très nettement les taches correspondant respectivement au glycocolle et à l'acide gamma-amino-valérianique.

En résumé, en ce qui concerne l'urine humaine, nous avons pu mettre en évidence après ingestion de salicylate de sodium, le fait qu'une hydrolyse ménagée fait apparaître dans l'urine essentiellement une combinaison d'acide levulique et de glycocolle

$$(CH_3 - CO - CH_2 - CH_2 - CO - NH - CH_2 - COOH)$$

que nous avons isolée sous forme d'hydrazone fondant à 118°. Cette hydrazone réduite par l'aluminium amalgamé est transformée en gamma-amino-valéryl-glycocolle. En effet, après hydrolyse chlorhydrique nous avons obtenu le glycocolle et l'acide gamma-amino-valérianique en passant par la lactame de ce dernier.

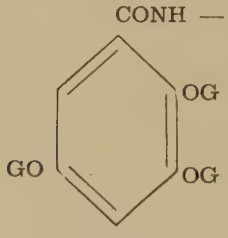
Expérience témoin.

Nous avons mené parallèlement à l'étude de l'urine de malades atteints de rhumatisme fébrile et soumis au traitement salicylé, celle de l'urine de sujets sains recevant une alimentation normale. Nous avons opéré sur un litre d'urine normale.

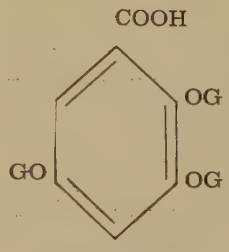
L'urine de l'homme se comporte exactement comme celle du lapin soumis à une alimentation normale : le chromatogramme des acides organiques ne présente pas de spot correspondant à celui de l'acide levulique, et après purification des acides nous n'avons pas obtenu de phényl-hydrazone caractéristique.

En conclusion on doit considérer que l'acide trihydroxy 2,3,5 benzoïque est un terme du métabolisme de l'acide salicylique chez l'homme.

La différence de comportement mise en évidence entre l'homme et le lapin réside dans le fait que le premier élabore un dérivé glycocollique et glycuronique, tandis que le lapin se contente d'effectuer une glycuroconjugaison (voir formule ci-dessous)



chez l'homme



chez le lapin

G = COOH — $(CHOH)_4$ — CHO

acide glycuronique.

CONCLUSIONS

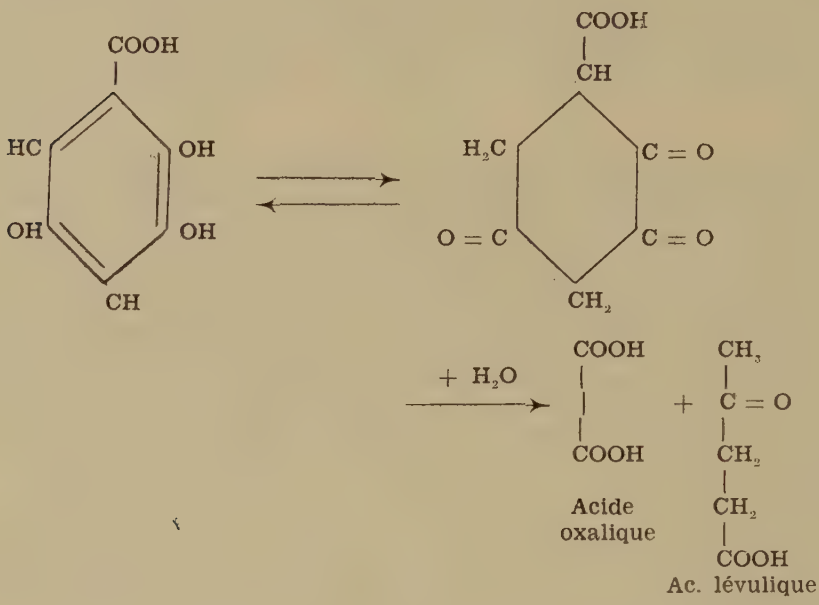
En définissant l'objet de notre travail, nous avons précisé que nos recherches consisteraient à déceler dans les urines de sujets ayant ingéré du salicylate de sodium des produits du métabolisme de ce dernier, qui auraient pu échapper aux analyses effectuées par les auteurs qui nous ont précédé dans ce domaine. Nous espérions ainsi pouvoir rapporter des données nouvelles sur le métabolisme des salicylates et sur le mode d'action de ce médicament.

En matière de conclusions, nous résumerons tout d'abord les résultats de notre travail expérimental, puis nous tâcherons de les interpréter dans le cadre du métabolisme des salicylates. Enfin, nous nous proposerons de considérer dans quelle mesure fut-elle même hypothétique, notre travail permet d'envisager le mécanisme thérapeutique de l'action des salicylates.

Nous ne reviendrons pas ici sur les détails techniques de nos expériences dont les résultats peuvent se résumer ainsi : l'analyse des urines de sujets (hommes ou lapins) ayant absorbé du salicylate de sodium, nous a permis de confirmer qu'elles contiennent une forte proportion d'acide salicylique et d'acide gentisique libres et combinés. Les combinaisons de ces corps ont lieu selon les processus classiques de désintoxication avec le glycocolle, et avec l'acide glycuronique.

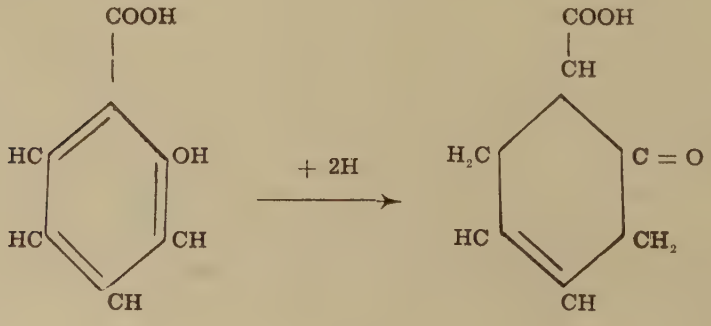
Mais nous avons essentiellement démontré que l'on doit admettre la présence dans les urines de nos sujets mis en expérience de l'acide 2,3,5 trihydroxy benzoïque à l'état de combinaison. Dans le cas des urines de lapins, les trois hydroxyles de cet acide triphénolique sont bloqués par une liaison osidique avec l'acide glycuronique. Il en est de même en ce qui concerne les urines humaines, mais dans ce cas nous avons montré que la fonction acide est en outre amidifiée par le glycocolle. Dans les deux cas l'osidification des fonctions phénoliques assure la stabilité du cycle de l'acide 2,3,5 trihydroxy benzoïque, ce qui justifie l'existence de ce corps à l'état combiné dans les urines. En effet, on sait que l'acide 2,3,5 trihydroxy benzoïque n'a qu'une existence hypothétique et que seul ses éthers phénoliques sont connus : on sait que dès que l'on cherche à saponifier ces éthers dans le but de préparer l'acide à l'état libre, le cycle aromatique s'ouvre en donnant des produits dont l'identification n'a pas été précisée. Nous ne pouvions donc pas envisager l'identification de cet acide 2,3,5 trihydroxy benzoïque par une autre méthode que celle consistant à rechercher les produits caractéristiques de sa dégradation. C'est ce que nous avons fait et les résultats de nos recherches nous ont permis d'identifier d'une façon absolue l'acide lévulique dans les urines de sujets soumis au traitement par des salicylates. Ces urines avaient été soumises préalablement à une hydrolyse acide effectuée dans le but de libérer l'acide glycuronique assurant la stabilité du cycle de l'acide 2,3,5 trihydroxy benzoïque. Par ailleurs cette hydro-

lyse devait s'accompagner de la dégradation spontanée de l'acide triphénolique au fur et à mesure de sa libération. Nos analyses nous ont donc permis de caractériser l'acide lévulique dans les hydrolysats urinaires. Nous pensons pouvoir interpréter ce résultat d'après le mécanisme réactionnel suivant :

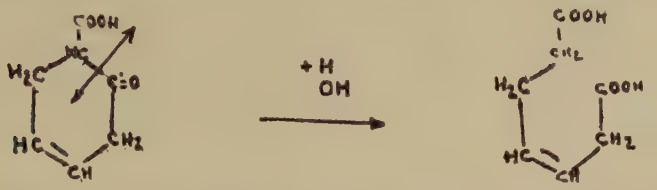


Cette équation chimique traduit dans un premier temps la simple tautomérisation de l'acide trihydroxy benzoïque sous sa forme tricétonique et la rupture du cycle hexagonal selon une simple réaction d'hydrolyse.

L'identification de l'acide lévulique dans les hydrolysats urinaires est en accord avec le schéma réactionnel ci-dessous. Cependant il nous paraît utile de le justifier par des considérations complémentaires. Pour cela nous envisageons d'abord les réactions chimiques qui permettent le passage de l'acide salicylique à l'acide pimélique. Ce corps peut être préparé par réduction de l'acide salicylique au moyen du sodium au sein de l'alcool amylique. La réaction se schématise ainsi :



Une réaction d'hydrolyse permet de réaliser assez facilement la rupture du cycle entre les carbones C_1 et C_2 selon la réaction

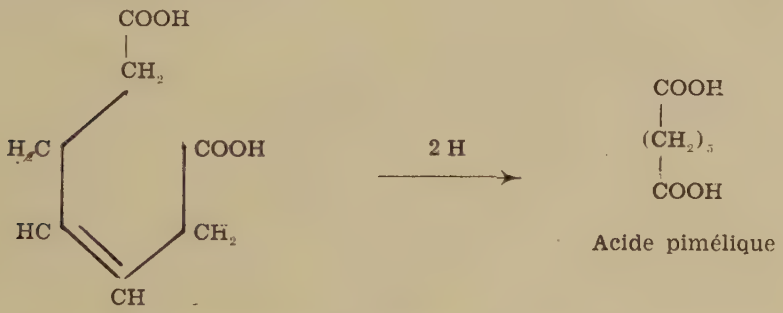


Il est important de noter ici que les premières réactions d'hydrogénation ont eu pour résultat de faire apparaître un groupement acide béta-cétotonique :

$$(HOOC - CH - C -)$$
$$\qquad\qquad\quad \| \quad \|$$
$$\qquad\qquad\quad O \quad O$$

caractérisé par la fragilité de la liaison entre les carbones alpha et béta. Une simple hydrolyse suffit à les séparer.

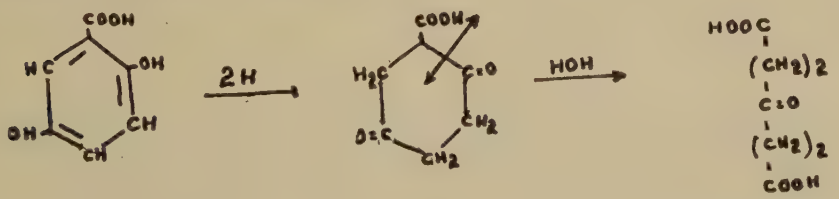
Le passage à l'acide pimélique implique une nouvelle réaction d'hydrogénation d'après :



Acide pimélique

Il y a lieu de noter que le passage de l'acide salicylique à l'acide pimélique la mise en œuvre de réactifs énergiques et qu'il exige l'apport de 4 atomes d'hydrogène.

Le mécanisme de la préparation de l'acide gamma-cétopimélique à partir de l'acide gentisique présente d'évidentes analogies avec les réactions précédentes. C'est par réduction, au moyen d'amalgame de sodium et par hydrolyse que l'on parvient au résultat désiré selon les équations chimique ci-dessous :



Acide gamma cétopimélique

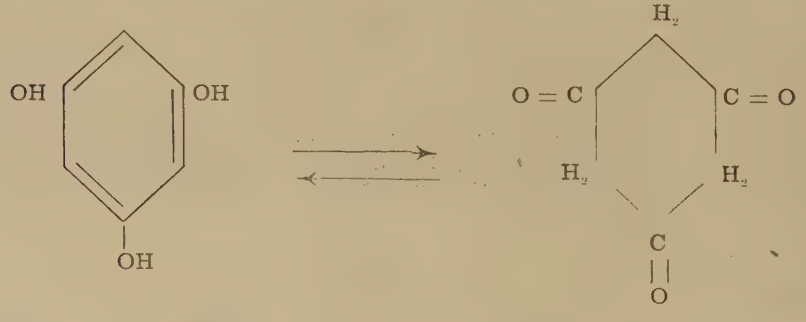
Ici encore on constate que l'hydrogénation a fait apparaître le groupement acide beta-cétonique, point faible de la molécule qui se trouvera ouverte par rupture de la liaison entre les carbones C_1 et C_2, à la suite d'une simple réaction d'hydrolyse. On voit que ces deux mécanisme réactionnels d'ouverture du cycle de l'acide salicylique et de celui de l'acide gentisique présente des analogies frappantes. Néanmoins, on notera une différence essentielle : en ce qui concerne l'acide gamma ceto-pimélique à partir de l'acide gentisique est réalisé avec seulement 2 atomes d'hydrogène.

Si maintenant nous nous reportons à l'équation chimique qui traduit la dégradation de l'acide 2,3,5 trihydroxy-benzoïque en acide levulique nous constatons que cette réaction se fait sans apport d'hydrogène.

En résumé, la multiplication des fonctions phénoliques sur l'acide benzoïque a bien pour effet de diminuer la stabilité du cycle aromatique. Mais nous croyons particulièrement important de souligner que l'on peut traduire le degré de stabilité de ces acides phénoliques par la difficulté plus ou moins grande que l'on éprouve à effectuer la réaction d'hydrogénation qui précède l'ouverture du noyau par hydrolyse.

Pour préciser, c'est bien l'acide salicylique qui présente le maximum de stabilité ; en effet, la réduction nécessaire à faire apparaître le point faible de la molécule, à savoir le groupement acide beta-cétonique impliqué 4 atomes d'hydrogène.

On doit considérer que l'acide gentisique est moins stable que l'acide salicylique puisque le groupement facilement hydrolysable acide beta-cetonique se forme par l'intervention d'une quantité moindre d'hydrogène, soit deux atomes au lieu de quatre atomes. Enfin, nous ne devrons pas nous étonner de l'extrême instabilité de l'acide 2,3,5-hydroxy-benzoïque puisque dans ce cas l'intervention de l'hydrogène est inutile et que la structure acide beta-cetonique apparaît par une simple réaction de tautomérisation. Encore faut-il que l'on puisse admettre que cette tautomérisation est possible. Nous n'avons pas l'intention de le démontrer mais simplement d'indiquer cette possibilité en considérant l'existence de la phloroglucine sous sa forme tricétonique selon :



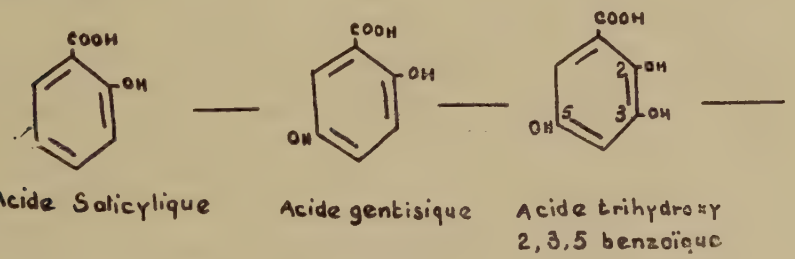
En résumé, l'ensemble de ces considérations nous permet de bien mettre en évidence l'instabilité décroissante du cycle aromatique chez les acides gentisique, et 2,3,5-hydroxy-benzoïque.

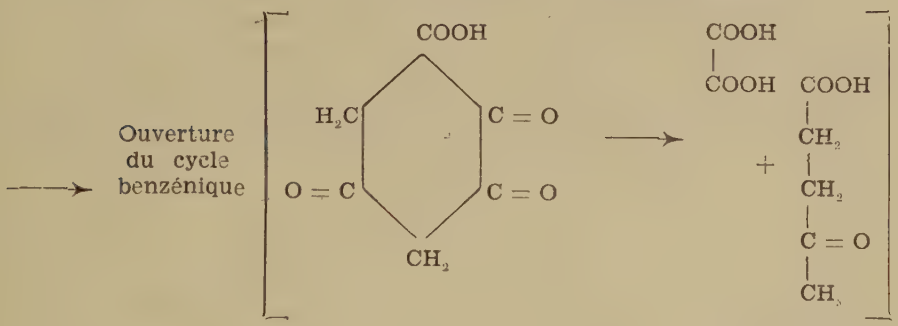
Dans le cas du métabolisme des salicylates, l'organisme procède à l'attaque du noyau aromatique, non pas par voie de réduction, mais voie d'oxydation. Le résultat est le même et c'est, en définitive, ce que nos recherches mettent en évidence en démontrant que l'acide salicyli-

que est successivement oxydé en acide gentisique puis en acide 2,3,5-hydroxy-benzoïque, terme précurseur de l'ouverture du noyau aromatique L'acide 2,3,5-trihydroxy-benzoïque apparaît donc comme un terme du métabolisme des salicylates aussi bien chez l'homme que chez le lapin. Nous ajoutons ainsi un nouveau terme à l'étude du métabolisme des salicylates que l'on peut considérer comme une suite d'oxydations consistant à transformer successivement l'acide salicylique en acide diphénol (acide gentisique) et en acide triphénol (acide trihydroxy-2,3,5-benzoïque). Ce dernier, inconnu à l'état libre, doit exister dans l'urine de sujets soumis au traitement salicylé sous la forme de glycuro-conjugaison (lapin) ou de combinaison avec le glycocolle et l'acide glycuronique (Homme). Nos conclusions s'appuient sur le fait que dans tous les cas, nous sommes parvenus à mettre en évidence la présence de l'acide lévulique dans les hydrolysats d'urine des individus normalement alimentés.

L'acide lévulique est le produit caractéristique de la décomposition spontanée de l'acide trihydroxy-2,3,5-benzoïque survenant lors de l'hydrolyse ménagée à l'urine.

Notre travail permet par ailleurs d'envisager la suite des mécanismes d'oxydation par lesquels l'organisme peut parvenir à réaliser l'ouverture du noyau aromatique dans le cas des salicylates et que l'on peut résumer ainsi :





Acide lévulique

On voit que l'organisme ne parvient que difficilement à rompre le noyau aromatique puisque, en définitive, bien faible est la fraction de l'acide salicylique (moins de 15 %) qui parvient au terme de l'acide trihydroxy-benzoïque, précurseur immédiat de la rupture du cycle aromatique.

Il nous reste à examiner dans quelle mesure nos résultats permettent d'apporter une contribution à l'explication de l'action thérapeutique

des salicylates. Nous entrons ici dans le domaine des hypothèses proposés comme conclusion à notre travail. Cependant, nous pensons que les considérations suivantes ne sont pas dénuées d'intérêt. Les acides phénols que nous avons considérés, à savoir l'acide salicylique, l'acide gentisique et même l'hypothétique acide trihydroxy 2,3,5-benzoïque, ne paraissent pas avoir d'action spécifiques contre les germes infectieux ; ce ne sont ni des antiseptiques ni des antibiotiques puissants. Aussi bien leur action dans le rhumatisme ne peut-elle être qu'indirecte. Peut-on préciser cette action indirecte ? Cela ne nous paraît pas impossible à la lumière des faits suivants que nous soumettons à l'appréciation du lecteur. Les salicylates sont peu toxiques. C'est un fait. Cependant, de par leur structure phénolique, il est indiscutable qu'ils déclenchent les mécanismes les plus actifs dont l'organisme dispose pour assurer sa détoxication, à savoir :

1° des réactions biologiques d'oxydation (oxydation de l'acide salicylique en acide gentisique et en acide trihydroxy-benzoïque ;

2° des réactions de glycuroconjugaison (les acides phénols ou polyphénoliques apparaissent, en grande partie sous forme de glycuroconjugaison) ;

3° des réactions d'amidification (conduisant par exemple à la formation d'acide salicylurique) ;

4° et, enfin, l'hypersecrétion de corticoïdes qui fait considérer les salicylates comme des médicaments hormono-poïétiques.

Si l'on veut bien nous permettre une image, nous dirons qu'il s'agit d'un véritable branle-bas de combat contre l'intoxication salicylée dont l'organisme profite alors pour vaincre non seulement l'intoxication salicylée, mais en même temps l'infection rhumatismale.

Si l'on préfère une expression moins imagée, nous dirons que le rhumatisme se trouve être combattu par les moyens généraux de lutte contre les infections ou les intoxications qui ont été déclenchées d'une façon non spécifique, par l'administration des salicylates.

Si notre hypothèse est exacte, il ne faudrait plus parler de la salicylothérapie comme d'une médication spécifique du rhumatisme, ce qui nous montre que notre langage peut induire en erreur, même lorsqu'il se propose de traduire des faits aussi solidement établis que l'efficacité de l'administration de salicylates aux rhumatisants. En bref, le rhumatisme guérirait à la faveur de l'intoxication salicylée.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALBAHRI Cl. — « *Maladies médicamenteuses* ». Masson, Ed. 1953, p. 145.
2. ALPEN, MANDEL, RODWELL and SMITH. — *J. Pharmacol.*, 1951, 102, 150.
3. BALDONI A. — *Arch. Pharmacol.*, Sper., 1914, 18, 241-247.
4. BAMBERGER et H. VON KLIMBURG. — *Monatsh.*, 1917, 38, 467.
5. BARBOUR H.-G. — *Arch. Intern. Méd.*, 1919, 24, 232-264.
6. BARBOUR H.-G. — *Physiol. Rev.*, 1921, 1, 295-326.
7. BEYKEMA, GOUDSMIT. — *Pharm. Weekblad*, 1934, 71, 196 ; *C. I.*, 1934, 32, 143.
8. BISTRZYCKI A. et St VON KOSTANECKI. — *Ber.*, 1885, 18, 1984.
9. BLUME W. et BRUENIG P. — *Arch. exper. Path. Pharm.* 1931, 16, 181-195.
10. BLUME W. et BUCHHOLZ C. — *Arch. Exper. Path. Pharm.*, 1932, 166, 472-492.
11. BLUME W. et FISHER F.-W. — *Arch. Exper. Path. Pharm.*, 1935, 179, 646-654.
12. BARDLEY W.-B., SCHNEDORF J.-G. et IVY A.-C. — *Am. J. Digestive diseases*, 1939, 3, 415.
13. BRAY, RYMAN and THORPE. — *Biochem. J.*, 1948, 43, 461.
14. BRÂY, THORPE and WHITE. — *Biochem. J.*, 1950, 46, 271.
15. BRUNNER K. — *Ann.*, 1907, 351, 313.
15. CAPELLETI A. — *Rev. Quim. Farm.* (Rio-de-Janeiro), 1936, 1, 121.
17. CHAMPY M. et DENAY M. — *Bull. Acad. Nat. Méd. Paris*, 1951, 135, 13.
18. CHEFTEL, MUNIER, MACHEBŒUF. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, 33, 840.
19. COBURN A.-F. — *Bull. John Hopkins Hosp.*, 1943, 73, 435-64.
20. DUMAZERT C. et BOZZI TICHADOU M. — « Nouveau dispositif d'élution capillaire pour la chromatographie sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, p. 169.
21. DYKE S. C. — *Lancet*, 1935, 229, 613.
22. FALTIS Fr. et KLOIBER Fr. — *Monatsh*, 1929, 53-54, 620.
23. FILOMENI M. — *Arch. Pharmacol. Sperm.*, 1937, 63, 183 et 193.
24. FISHER E. et GROH R. — *Ann. Chem.*, 1911, 383, 363-372.
25. GALIMARD J.-E. — *Bul.. Suc. Chim. Biol.*, 1944, 26, 185-192.
26. GOLBERG A., PRAKT J., *Chem.*, 1879 (2), 19, 371.
27. GORIS A. et CANAL H. — *Bull. Soc. Chim.*, 1936 (5), 3, 1982.
28. GRILL. — *J. Am. Ph. Assoc.*, 1932, 21, 765.
29. GROSS et GREENBERG. — « The salicylates », *Hirhouse press New-Haven*, 1948.
30. HANZLIK. — *Médecine monograph.*, vol. 9, *Williams and Winkins, Baltimore*, 1927.
31. HANZLIK, PRESHO. — *J. Pharm.*, 1923, 21. 247.
32. HEMMELMAYR Fr. — *Monatsh.*, 1913, 34, 365.
33. HEMMELMAYR Fr. — *Monatsh.*, 1912, 33, 972 et 994.
34. HEMMELMAYR Fr. — *Monatsh.*, 1911, 32, 786.
35. HEYN L.-G. — *J. Am. Méd. Assoc.*, 1914, 63, 1004-5.
36. HLASIWETZ H. et BARTH L. — *Ann.* 1866, 139, 81.
37. HOMBURGER F. — *Am. J. Méd. Sci.*, 1945, 210, 168-72.
38. JACKSON A.-V. — *J. Path. Bact.*, 1948, 60, 587-93.
39. KAPP E.-M. — Dissertation for ph. D. Columbia Univ., 1942.
40. KAPP E.-M. et COBURN A.-F. — *J. Biol. Chem.*, 1942, 145, 549-565.

41. KAPP et COBURN. — *J. Biol. Chem.*, 1942, 145, 549.
42. KELEMEN E., MAJOROS M., IVANYL S. et KOVACS K. — *Experientia*, 1950, 6, 435.
43. LESTER D., LOLLI G. et GREENBERG L.-A. — *J. Pharm.*, 1946, 87, 329-42.
44. LOLLI G. et SMITH R. — *New-Engl. J. Med.*, 1946, 235, 80-4.
45. MARTINS V. — *Tribuna Farm.*, 1934, 3, 8 et 30.
46. MAUGHAN G.-B., EVELYN K.-A. et BROWNE S. L. S., *J. Biol. Chem.* 1938, 126, 567-72.
47. MILLER A.-K. — *Ann.* 1883, 220, 113.
48. MONCORPS C. — *Arch. Exper. Path. Pharm.*, 1929, 163, 377 - 405.
49. MURAKAMI M. — *Ann.*, 1932, 496, 149.
50. PARKER, QUART. — *J. Med.*, 1948, 17, 229.
51. PAUL. — *Brit. Med. J.*, 1951, 1, 139.
52. PELOUZE A. — *Ann. Chem. Phys.*, 1833 (2), 54, 350.
53. PREUSSE C. — *Z. Physiol. Chem.*, 1878, 1879, 2, 332.
54. QUILLEY and SMITH. — *J. Pharm.*, 1952, 4, 624.
55. TOSKAM J. — *Acta Clin. Belgica.*, 1948. 3, 305.
56. ROSCAM J. et VAN CAUWENBERGE H. — *Sem. Hop. Paris*, 1952, 28, 1150.
57. SCHIFF H. — *Ann.*, 1888, 245, 37.
58. SENHOFER C. et BRUNNER C. — *Montash* 1880, 1, 468 et 476.
59. SENHOFER C. et BRUNNER C. — *Ber Akad. Wien.*, 1880, 2, 506.
60. SCOTT R.W. et TROBURN T.W. et HANZLIK P.J. — *J. Pharmacol.* 1917, 9, 217-25.
61. SMITH. — *J. Pharmacol.*, 1948, 27, Part 2, 353.
62. SMITH L. E. et LAFORGE F.-B. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1931, 53, 3072.
63. SMITH P.-K., GLEASON H.-L., STOLL C.-G. et ORGOZALEK S. — *J. Pharmacol.*, 1946, 87, 237-55.
64. TAYEAU F. et NEUZIL E. — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, 141, 79-80.
65. THIELE et JAEGER K. — *Ber.*, 1901, 34, 2840.
66. THIEMANN Ferd. et PARRISIUS A. — *Ber.*, 1880, 13, 2354-76.
67. VAN CAUWENBERGE H. — Symposium über die Beeinflussung des reaktiven geschehens durch hypohyse und noben nierentinde. 1951. — *Bull. Schweiz Akad. der med. Wissensch.*, 1952, 8, 139.
68. VAN CAUWENBERGE H. et LECOMTE J. — *Experientia*, 1952, 8, 469.
69. WILL W. et ALBRECHT K. — *Ber.*, 1884, 17, 2098.
70. WRIGHT S. — *J. Pharmacol.*, 1935, 54, 1-16.